

## 穀類蛋白質に関する電気泳動的研究

堀内 晶子・牧 善輔

### Electrophoretic Studies on Cereal Proteins

AKIKO HORIUCHI and ZENSUKE MAKI

大麦、あわ、きび、もろこしの蛋白質を溶解度法により分離抽出し、その組成を明らかにした。さらに、2-メルカプトエタノール、及び SDS を加え、不溶な蛋白質の一部を抽出可能にした。各抽出蛋白質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及び、焦点電気泳動を行なった結果、大麦、あわ、きびのアルコール可溶性蛋白質、アルカリ可溶性蛋白質は、各々の泳動パターンに共通な所が認められた。

### I 緒 言

複雑な蛋白質組成を持つ小麦の蛋白質に関しては、適当な溶媒に対する溶解度の差を利用して、分離した Osborne らの研究をはじめとして、多くの電気泳動的研究も見られる<sup>1),2)</sup>。しかし、大麦、あわ、きびなどの蛋白質に関する研究は、数少ない。そこで、これらの穀類蛋白質について、溶解度法により、種々の溶媒で抽出を試み、その抽出方法を検討した。また、各抽出蛋白質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、焦点電気泳動により、電気泳動の特性を比較したので、ここに報告する。

### II 実験方法

#### 1) 供試料

実験に用いた穀類は、1972年に京大付属農場で収穫された大麦（茜裸）、もろこし、並びに市販のあわ及びきびで、これらの試料は、外皮と一緒に全粒を細かく粉碎し60から80メッシュのふるいを通る粉末として用いた。

#### 2) 蛋白質成分の抽出分離法

蛋白質を分離抽出する前に、*n*-ブタノールで約5時間脱脂した。

大麦、あわ、きびの抽出は、カラス麦に対して、Victor<sup>3)</sup> らが用いた方法に準じ、水、1M NaCl、70% エタノール、0.1 N 酢酸、0.05 N NaOH により順次抽出した。きびは0.1 N 酢酸による抽出蛋白質がごくわずかなため、抽出を省いた。

もろこしの抽出は、70%エタノールの代りに、60% *t*-ブタノールを用い<sup>4)</sup>、他の溶媒は、大麦などと同じ物を用いて試みたが、抽出可能な蛋白質が少なかった。ので、Ramamurthi ら<sup>5)</sup>による方法に従って、水、1M NaCl、70%イソプロパノール、0.6%2-メルカプトエタノールを含む70%イソプロパノール、0.6%2-メルカプトエタノール及び0.5% SDS を含む0.5 M NaCl ホウ酸緩衝液を用いて抽出した。

又、あわ、きびについては、前記の抽出により不溶な蛋白質をさらに、0.6%2-メルカプトエタノールと0.5% SDS を含む0.05 N NaOH を用いて抽出した。

各溶媒による抽出操作は、まず、脱脂粉末試料に、蒸留水を加え、低温（約6°C）で、60分間、スターラーでゆるやかに攪拌抽出後、冷却遠心分離した。（20分間、5000×g）さらに、沈澱に同様の操作を2回繰り返し、上澄を集めた。次に、1 M NaCl により、水と同様に3回抽出を繰り返した後、沈澱物中の NaCl を除くため、3回、水洗を行なった。最初の洗浄液は、NaCl 抽出液と一緒に集めた。次に、60°C にて、70%エタノール抽出を NaCl 抽出と同様に行なった。0.1 N 酢酸、0.05 N NaOH、0.6% 2-メルカプトエタノールと0.5% SDS を含む0.05 N NaOH による抽出は、室温で60分間3回抽出、3回水洗を行ない上澄液を集めた。

次に、これら抽出液を透析後、低温で濃縮し、凍結乾燥した。

#### 3) 窒素の定量

A.O.A.C. の micro Kjeldahl 法により、窒素の分析を行ない、6.25を乗じて、蛋白質量とした。

## 4) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ゲルは、3 M 尿素を加えた乳酸アルミニウム緩衝液 (pH 3.1) を含む 5% ポリアクリルアミドゲルを用いた。大麦の水、塩、アルコール可溶性各蛋白質は、200 V、5 時間、酸、及びアルカリ可溶性蛋白質は、300 V、5 時間、あわ、きびは 150 V、16 時間、いずれも低温 (約 6°C) で泳動した。

試料の調製は、大麦は各抽出蛋白質を 0.01 N 酢酸に溶解後、上澄を凍結乾燥し、緩衝液に完全に溶解して用いた<sup>6)</sup>。あわ、きびは、この操作を省き、各抽出蛋白質をそのまま、緩衝液に溶解し、遠沈後上澄のみを用いた。いずれの場合にも、かなりの不溶性成分が生じた。

試料の還元は、上述の泳動用試料液に、大麦では、0.2 M。他の試料は、10 M になる様に、2-メルカプトエタノールを加え、一夜放置して行なった。

染色は、0.05% ニグロシン-10% 酢酸を用いた。

5) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>7)</sup>

0.1% SDS を含んだ 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動条件は、1 カラムにつき、8 mA の定電流で、約 3 時間泳動した。

染色は、0.5% アミドブラック-20% 酢酸で行なった。分子量の決定には、標準蛋白質として、オボアルブミン (MW, 43,000), ペプシン (MW, 36,000),  $\alpha$ -キモトリプシン (MW, 26,000), トリプシン (MW, 24,000) を用いた。

6) ゲル焦点電気泳動<sup>8), 9)</sup>

ディスク電気泳動装置を用い、ポリアクリルアミドゲルを支持体として行なった。

ゲルは、31% アクリルアミドゲルを含む 8 M 尿素溶液、0.004% リボフラビンを含む 8 M 尿素溶液、40% Carrier ampholytes (pH 3.0~10.0), 8 M 尿素溶液を 2 : 1 : 0.2 : 4.8 の割合に混合し、脱気後、内径 0.5 cm、長さ 9 cm のガラスカラムに、8 cm の高さまで入れ、蛍光灯で照射し、ゲル化した。

試料は、8 M 尿素溶液に溶解後、上澄のみを、高さ 1 cm にゲル上に重層し、陽極電解液として、1% HCl、陰極は 1% TEMED を用いて、40 V/cm 3 時間泳動した。泳動後、10% トリクロル酢酸で、ampholytes を除去後、0.04% コマジブルを含む 12.5% トリクロル酢酸で染色した。pH の決定は、ゲルを 5 mm 間隔に切って、蒸留水 2 ml に浸漬後、pH を測定した。

## III 結果及び考察

## 1) 蛋白質の分離抽出

表 1 に全粒中の蛋白質含量を示した。

表 2 に脱脂粉末試料より、各溶媒で抽出分離した分画の窒素の定量を行なって、その組成を示した。

大麦は、抽出区分 FIV が多いことが特徴的で、FV-1 が次いで多い。きびなどと比較して、不溶性蛋白質が少ない。あわは、FIII-1 の占める割合が多く、FV-1 も比較的多いが不溶性蛋白質が 42% も占めた。きびでも FIII-1 が占める割合が比較的多いが、抽出不可能

Table 1 Protein Content

	Barley	Foxtail Millet	Proso Millet	Grain Sorghum
Protein Content (N $\times$ 6.25) %	12.4	11.1	12.7	7.5

Table 2 Nitrogen Distribution in Cereal Proteins

	Fraction	Barley	Foxtail Millet	Proso Millet	Grain Sorghum	
FI	Water soluble protein	6%	4%	2%	4%	
FII	Saline soluble protein	8	5	3	3	
FIII-1	Alcohol soluble protein 1	7	25	11	a) 1	b) 11
FIII-2	Alcohol soluble protein 2	—	—	—	—	c) 22
FIV	Acetic acid soluble protein	23	1	少量	少量	—
FV-1	Alkali soluble protein 1	18	13	5	17	d) 6
FV-2	Alkali soluble protein 2	—	e) (4)	(15)	—	f) 43
	Residue	12	42	65	75	8

a) 60% t-butyl alcohol

b) 70% isopropyl alcohol

c) 70% isopropyl alcohol (v/v) with 0.6% 2-mercaptoethanol (v/v)

d) Borate buffer with NaCl (pH 10, 0.5 M) and 0.6% 2-mercaptoethanol (v/v)

e) 0.05 N NaOH with 0.6% 2-mercaptoethanol and sodium lauryl sulfate

f) Borate buffer with NaCl, 0.6% 2-mercaptoethanol and sodium lauryl sulfate

な蛋白質が非常に多い。そこで、あわ、きびを、0.05 N NaOH で抽出後、さらに、0.6%2-メルカプトエタノール及び SDS を含む 0.05 N NaOH で抽出を試みた所、あわでは 4%, きびでは、15%の蛋白質が抽出された。

もろこしについて、表 2 の左側に示した結果では、抽出不可能な蛋白質が 75% と非常に多かったが、右側に示したように還元して抽出すると、不溶な蛋白質が、8% となり、非常によい抽出結果を得た。FV-2 の占める割合が、43% と多く、FIII-2 がこれに次いで多かった。

また、もろこしの抽出結果より考えると、あわ、きびについても、アルコール抽出の際に、2-メルカプトエタノールを加えて抽出を試みても必要があったと思われる。

酢酸による抽出では、大麦のみに抽出可能な蛋白質を多く認めたが、カラス麦の蛋白質でも、この蛋白質の占める割合がかなり多い結果が報告されている<sup>9)</sup>。

次に表 3 に、凍結乾燥抽出物中の N の分析の結果を示した。この結果より、これらの抽出物中には、蛋白質以外の物質がかなり存在していることがわかる。

## 2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

図 1 に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示した。抽出区分 FI は、大麦では 2 本、あわ、きびは、パターンの似た 5 本のバンドに分画した。FII は、大麦では 3 本、あわ、きびは 2 本に分画した。又、小麦に関する報告では、FI は 12 本、FII は 5 本に分画したことが示されている<sup>10)</sup>。FIII-1 は、大麦では 2 本、あわは 7 本、きびは 4 本に分かれ、易動度がほぼ等しい成分がこれらの試料に含まれていた。小麦では、11 本のバンドが示されている<sup>10)</sup>。FIV は、大麦は、原点よりひきずった濃いバンドともう 1 本のバンドを示した。あわは、易動度の比較的大きい薄い 2 本のバンドがあり、両者のパターンは、全く異なった。

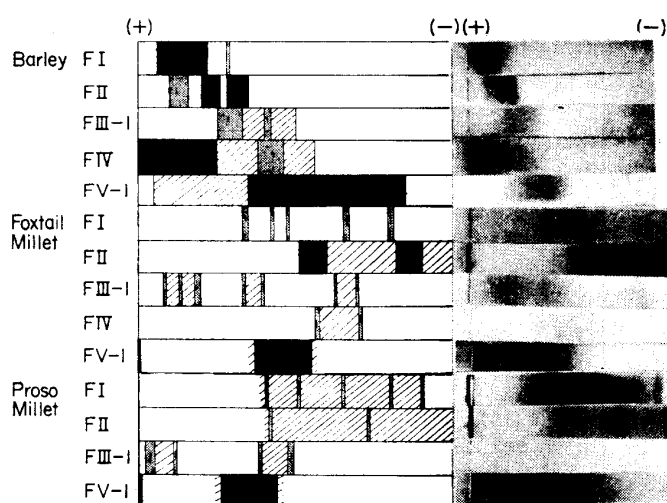
**Table 3** Nitrogen Analysis of Solid Protein Extract

Fraction	N in extract, %			
	Barley	Foxtail Millet	Proso Millet	Grain Sorghum
Water solubles	11.0	10.6	9.4	7.4
Salin solubles	11.2	13.3	9.1	8.7
Alcohol solubles 1	11.3	14.6	13.1	4.2 9.3
Alcohol solubles 2	—	—	—	—13.2
Acetic acid solubles	12.7	9.2	—	—
Alkali solubles 1	11.0	14.1	11.0	6.6 5.0
Alkali solubles 2	—	11.0	12.7	—12.6

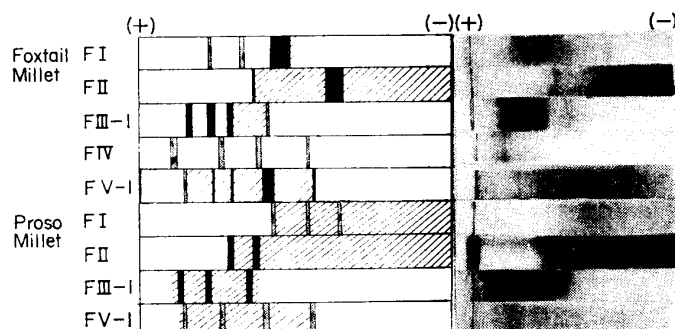
FV-1 は、大麦では、単一のバンドを示したが、小麦のこの区分の蛋白質は、ゲル中を移動しないと言われている<sup>10), 11)</sup>。これは、分子の形や大きさのため、ゲル中を通過出来ないと考えられているが、きびについては、原点に残り、ゲル中を移動出来ない成分と、ゲル中を移動する単一の濃いバンドが見られた。FV-2 については、図に示さなかったが、あわでは、FV-1 と同じ易動度の濃い 7 本のバンドと、より早い易動度の濃い 1 本のバンドに分かれた。きびでは、全体に薄く易動度が小さかったが、FV-1 と一部重なる易動度を持った単一のバンドを示した。

各抽出蛋白質中の S-S 結合を還元した場合の影響を図 2 に示した。大麦について、0.2 M の 2-メルカプトエタノールにより還元したが、全く変化が見られなかった。

FI は、あわ、きびとも 5 本のバンドが 3 本となった。FII は、あわ、きびともバンドの数に変化はないが、易動度の減少を見た。FIII-1 は、あわでは、還元後、バンドが全体に濃く鮮明となり、易動度の減少が見られた。きびでも、濃い鮮明なバンドを示し、バンドの一部は易動度が減少した。小麦のグリアジンを



**Fig. 1** Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of cereal proteins.



**Fig. 2** Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of reduced cereal proteins.

還元した場合、バンドの数の明らかな増加や、主な成分の比率に変化は見られないが、もとの蛋白質と比較すると易動度が約20%減少していることが示されている<sup>11)</sup>。この様に、還元後、易動度が減少することは、多分、分子内に分裂が起り、構造的な変化の結果、ゲルの穴を通過しにくくなるためであると考えられている。FV-1 は、単一なバンドであったものが、あわでは5本、きびでは4本のバンドに分かれ、原点に残っていた成分が、ほとんどなくなった。バンドの易動度を見ると、還元後の FIII-1 の最も早いバンドより早い成分があわ、きびともに存在する。このことは小麦についても、示されており、小麦では、還元前は、ゲル中を移動しなかったが、還元後、20成分にも分離し、主な成分は、7つあったことが報告されている<sup>11)</sup>。あわ、きびにおいて、FIII-1 の還元後のバンドと FV-1 の還元後のバンドに、易動度が一致する成分が見られる。以上のことより、FV-1 は、多くのポリペプチドから成り、FIII-1 を構成するポリペプチドをも含んでいるのではないかと考えられる。

### 3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

図3に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示した。

抽出区分 FI は、大麦では、24,500から、42,000の間に、5つのバンドを示したが、主なバンドは24,500, 27,000, 39,000 の分子量に相当した。あわでは、23,600から、51,700の間に12本のバンドに分かれたが、23,600, 29,500, 36,500のバンドが主に濃かった。きびでは、23,900から52,200の間に、あわと同様12本のバンドを示し、そのパターンもよく似ていた。

FII は、大麦では4本のバンドに分かれ、23,000が濃かった。きびでは23,000から56,200の間に比較的是っきりした12本のバンドを示し、23,000, 26,500, 28,700, 41,000, 46,000, 47,300の分子量の物が濃かった。あわでは、全体に薄かったが、22,900 から51,500の間に15本ものバンドに分かれた。

FIII-1 では、大麦は、10本のバンドに分かれ、26,000, 27,500, 36,000が主なバンドで、あわでは、7本に分かれ、24,500, 28,800 から32,000 の間の分子量に相当するものが多く、あわは5本のバンド中、24,500, 25,900, 29,100に相当するバンドが濃かった。これらの穀類の FIII-1 は、よく似た分子量のポリペプチドを主な構成成分として持っていることがわかる。小麦では33,000から46,000の間に、8つのバンドに分かれ、主なバンドは33,000と38,000に相当することが報告されている<sup>7)</sup>。

FIV は、大麦では、7つのバンドに分かれ、22,800,

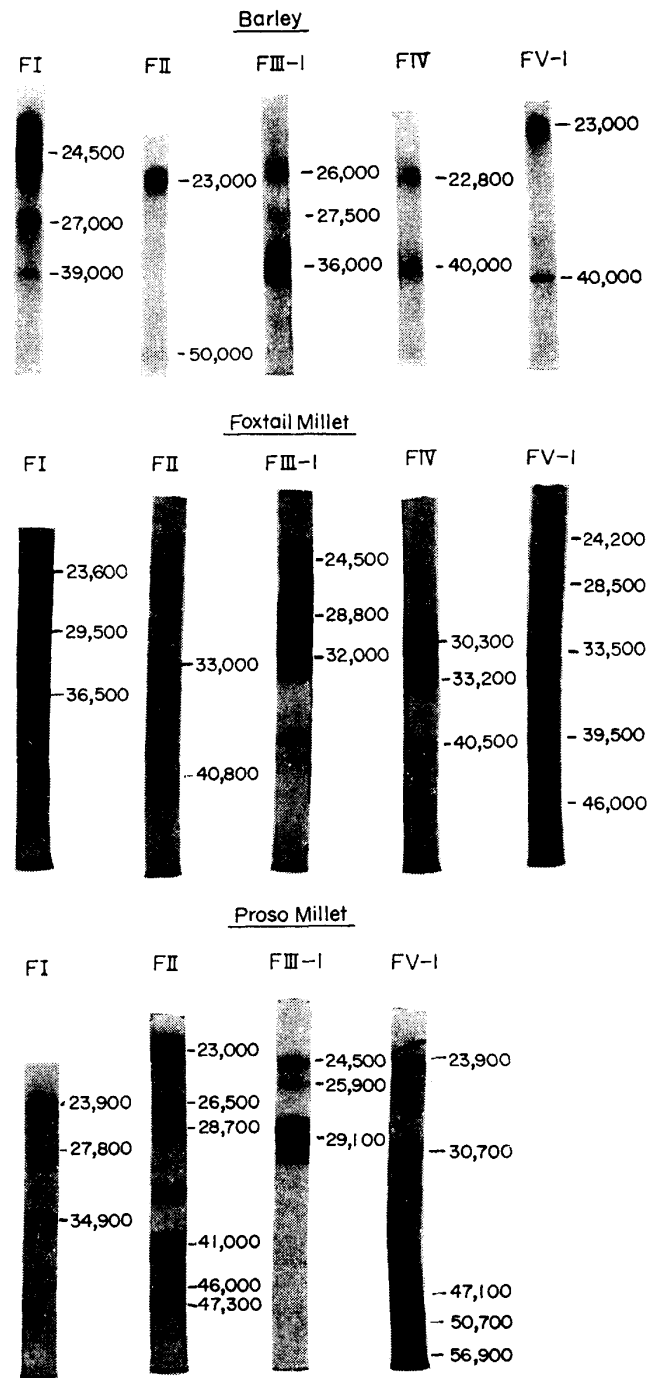


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of cereal proteins.

40,000が主なバンドで、あわでは、6つに分かれたが、原点にもかなり成分が残っている。主なバンドは、30,300と33,200であった。

FV-1 は、大麦では、4本に比較的是っきり分かれたが、あわ、きびでは、原点に多くの成分が残り、全体にひきずった様子を呈し、バンドがはっきりしていないが、あわでは11、きびでは14のバンドに分かれた。原点に残った成分を移動させるため、7.5%ゲルでも試みたが、10%ゲルと変わらなかった。小麦について

は、31,000 から 104,000 の間に明確な 8 つのバンドに分かれると言われているが<sup>7)</sup>、この場合アクリリトリルを用いアルキル化して S-S 結合の再酸化を防いでいる。

#### 4) ゲル焦点電気泳動

図 4 に、ゲル焦点電気泳動を行なった結果を模式図で示した。

抽出区分 FI は、大麦、あわ、きびいずれも、pH 4.7 から 5.5 付近に等電点を持つ成分が濃いバンドを示した。

FII は、大麦では、アルカリ側に等電点を持つバンドが濃く (pH 9.05 から 9.20)、あわでは pH 7.1 から 8.8 の間にバンドの分布を多く見たが、きびでは、主なバンドが 5.05, 5.3, 6.2 と少し酸性側に等電点を持つ成分が多かった。

FIII-1 は、大麦では、pH 4.5 から 7.1、あわでは 4.5 から 7.7、きびでは 4.5 から 7.8、もろこしでも 4.5 から 6.0 の間に、主なバンドが集中し、いずれも濃い

はっきりしたパターンを示した。

FIV は、大麦のみしか行なわなかったが、pH 4.5 から 5.5 までに分布した。

FV-1 は大麦では、5.8, 6.25, 6.7, 7.2, 7.5、あわでは 6.2 から 6.75 の間、7.0, 7.35, 7.65、きびでは 6.2, 6.8, 7.2, 7.4 に濃いバンドが見られ、これらの蛋白質は、よく似た等電点を持っている。

もろこしの FI, FII, FV-1 は、明らかなバンドが見られなかった。これは、試料が非常に溶解しにくかったためと思われる。FIII-2 及び FV-2 を見ると、濃くはっきりしたバンドが見られ、両者の等電点の分布は、非常によく似ており、pH 4.5 から 7.0 の間に集中していた。

## IV 総 括

大麦、あわ、きび、もろこしの蛋白質を溶解度法により抽出した結果、あわ、きびは、アルコール可溶性蛋白質が多く、大麦は、酢酸に可溶性蛋白質の占める割合が多かった。もろこしについては、不溶性蛋白質が多く、SDS および 2-メルカプトエタノールを加えることにより、抽出が可能となった。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びゲル焦点電気泳動の結果、あわ、きびの水溶性蛋白質は、よく似たパターンを示した。又、アルコール可溶性蛋白質は、あわ、きび、大麦において、一部易動度が等しい分画を持ち、分子量が、30,000 付近の成分が多く、等電点は、pH 4.5 から 7.0 付近に集っており、構成成分として、よく似たポリペプチドから成ると思われる。さらに、アルカリ可溶性蛋白質は、あわ、きび、大麦では、単一のバンドを示したが、還元後は、多くのバンドに分かれた。

(1975年 7 月 31 日受理)

## 文 献

- 1) R. W. Jones, N. W. Taylor and F. R. Senti: Arch. Biochem. Biophys., **84**, 363 (1959).
- 2) J. H. Woychik, J. A. Boundy and R. J. Dimler: Arch. Biochem. Biophys., **94**, 477 (1961).
- 3) Y. Victor Wu, Kenneth R. Sexson, James F. Cavins and George E. Inglett: J. Agr. Food Chem., **20**, 757, (1972)
- 4) R. W. Jones and A. C. Beckwith: J. Agr. Food Chem., **18**, 33 (1970).
- 5) Ramamurthi Jambunathan and Edwin T. Mwrzt: J. Agr. Food Chem., **21**, 692 (1973).

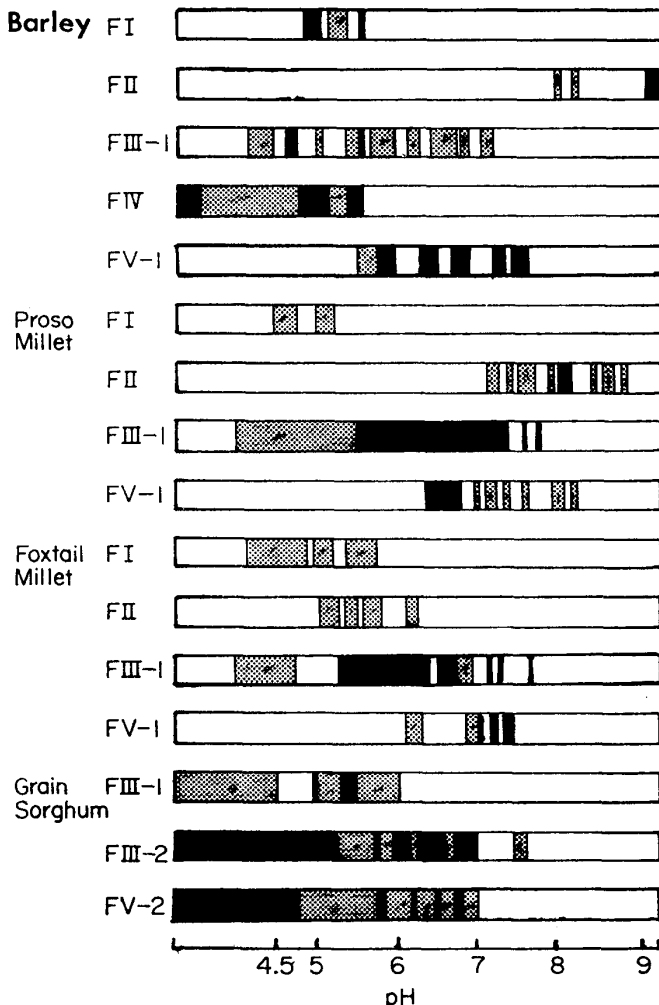


Fig. 4 Gel electrofocusing patterns of cereal proteins.

- 6) G. A. H. Elton and J. A. D. Ewart: J. Sci. Fd Agric., **15**, 119 (1964).
- 7) Zenichiro Hamauzu, Tsutomu Arakawa and Daizo Yonezawa: Agr. Biol. Chem., **36**, 1829 (1972).
- 8) 寺村 貞, 武藤尚志: 化学と生物, **8**, 636 (1970)
- 9) 金沢宏和, 米沢大造: 農化, **47**, 17 (1973)
- 10) 川端晶子: 栄養と食糧, **20**, 59 (1967)
- 11) J. H. Woychik, F. R. Huebner and R. J. Dimler: Arch. Biochem. Biophys. **105**, 151 (1964).